Sistema de pruebas TPO/Tg Plus

IVD

REF A51101

USO PREVISTO

El sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte®** TPO/Tg Plus de ZEUS tiene como objetivo la detección cuantitativa de anticuerpos de clase IgG a 2 antígenos de tiroide distintos, la peroxidasa tiroidea (TPO) y la tiroglobulina (TG) en el suero humano. El sistema de pruebas está diseñado para ser utilizado como ayuda en el diagnóstico de diferentes enfermedades tiroideas autoinmunes. Esta prueba está concebida exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Los anticuerpos tiroideos son un fenómeno característico en pacientes con las enfermedades de Hashimoto o de Graves (1). La presencia de anticuerpos tiroideos en el suero del 80% de los pacientes que sufren estas dos enfermedades hace que sea recomendable la realización de algún tipo de prueba de anticuerpos tiroideos en la evaluación de pacientes aquejados de bocio (1). Aunque los anticuerpos tiroideos están asociados principalmente con las enfermedades de Hashimoto o de Graves, también pueden encontrarse en el suero de pacientes aquejados de otras enfermedades, como por ejemplo mixedema, tiroiditis granulomatosa, bocio nodular no tóxico y carcinoma tiroideo (1). También aparecen anticuerpos tiroideos en la mayoría de los casos de tiroiditis linfocítica en niños (2), y en raras ocasiones en pacientes con anemia perniciosa y síndrome de Sjögren (3-4).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** TPO/Tg Plus de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de la clase IgG en suero humano ante TPO y Tg. El procedimiento de la prueba comprende dos pasos de incubación:

1. Los sueros de prueba (diluidos correctamente) se incuban en una mezcla multiplexada de la suspensión de microesferas. La suspensión de microesferas contiene una mezcla de conjuntos distinguibles de microesferas de poliestireno; cada uno conjugado con un antígeno diferente. Si está presente en los sueros del paciente, determinados anticuerpos se unirán con el antígeno inmovilizado en uno o más conjuntos de microesferas. Las microesferas se enjuagan para extraer las proteínas séricas no reactivas.
2. El IgG antihumano de cabra conjugado con ficoeritrina se añade al recipiente y la placa se incuba. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. A continuación, la suspensión de mircroesferas se analiza utilizando el instrumento **AtheNA Multi-Lyte**. El conjunto o conjunto de microesferas se clasifican (identifican) y la cantidad de molécula informante (conjugado PE) se determina para cada conjunto de microesferas. Mediante el empleo de *Intra-Well Calibration Technology®* (tecnología de calibración intrapocillo), se utilizan conjuntos de micropartículas de calibración interna para convertir fluorescencia sin procesar en resultado (unidades).

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBA

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): Suspensión de microesferas, controles, conjugado y SAVe Diluent®.**

SOLN	BEAD

1. Suspensión de microesferas: contiene microesferas de poliestireno de 5,6 micras separadas y distinguibles que se conjugan con los siguientes antígenos: Peroxidasa tiroidea (TPO) y tiroglobulina (Tg). La suspensión de microesferas también contiene un conjunto de microesferas diseñadas para detectar anticuerpos no específicos en la muestra del paciente (si está presente) y cuatro conjuntos de microesferas separadas que se utilizan para la calibración del ensayo. Un frasco de color ámbar que contiene 5,5 ml. Listo para usar.

CONJ

2. Conjugado: Ficoeritrina conjugada con IgG antihumana de cabra (γ específico de cadena). Una botella de color ámbar que contiene 15 ml. Listo para usar.

CONTROL	+

3. Control positivo (suero humano): Un vial de 0,2 ml con tapón rojo.

CONTROL	-

4. Control negativo (suero humano): Un vial de 0,2 ml con tapón verde.

DIL	SPE

5. Diluyente SAVe Diluent®: Una botella de 50 ml con tapón verde solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. **NOTA: El diluyente SAVe Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.**

WASHBUF	10X

6. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Una botella de 50 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X.

NOTAS:

1. **Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas AtheNA Multi-Lyte de ZEUS: Tampón de lavado y SAVe Diluent®**
2. **El sistema de pruebas también contiene:**
   a. **Una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.**
   b. **CD de calibración que incluye los valores de calibración del kit específicos de los lotes y necesarios para el análisis de la muestra y el control de calidad del ensayo, y prospectos del paquete.**
   c. **Una placa de disolución de 96 pocillos**.
   d. **Una placa del filtro de disolución de 96 pocillos.**

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No respire los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. La suspensión de microesferas **AtheNA Multi-Lyte** no contiene organismos viables. No obstante, el reactivo se debe considerar como un **peligro biológico potencial** y se debe manipular consecuentemente.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (5).
5. Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de empezar el ensayo**. Devuelva los reactivos no utilizados a una temperatura refrigerada inmediatamente después de su uso.

6. Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
7. El diluyente SAVe®, la suspensión de microesferas, los controles y el conjugado contienen azida sódica en una concentración de 0,1% (w/v). Se ha informado que la azida sódica forma azidas de plomo o cobre en las cañerías del laboratorio, lo que puede ocasionar explosiones al golpear con un martillo. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
8. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
9. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
10. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
11. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
12. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
13. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
14. Evite salpicar o generar aerosoles.
15. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación. La suspensión de microesferas y el conjugado son reactivos sensibles a la luz. Ambos se han embalado en envases que protegen de la luz. Las exposiciones normales que se experimentan durante el curso de la ejecución del ensayo no afectarán al rendimiento del ensayo. No exponga estos reactivos a fuentes potentes de luz visible de manera innecesaria.
16. Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
17. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
18. No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
19. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
2. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud 10 - 200 µl.
3. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
4. Pipetas serológicas.
5. Puntas de pipetas descartables.
6. Toallas de papel.
7. Cronómetro de laboratorio para controlar los pasos de incubación.
8. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)
9. Sistema**AtheNA Multi-Lyte** (Luminex® Instrument) con fluido envolvente (número de producto 40-50000).
10. Agua destilada o desionizada.
11. Vórtex.
12. Sonicador de baño pequeño.
13. Agitador de placas capaz de agitar a una velocidad de 800 RPM (opcional para el mezclado)
14. Aspirador de vacío y colector de vacío para lavar las microesferas.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

2°C – 8°C	Suspensión de microesferas: Extraiga solo la cantidad necesaria para analizar las muestras a los que se les va a realizar la prueba y devuelva la porción no utilizada a su almacenamiento.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de pruebas, control positivo, control negativo y diluyente SAVe Diluent®
2°C – 25°C	Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

1. ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
2. Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
3. Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica. No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias (6, 7).
4. Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a –20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad de cada laboratorio utilizar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (8).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Retire los componentes individuales del kit del lugar de almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25°C).
2. Determine el número total de Controles y muestras que se desean probar. Es necesario incluir el Control Negativo y el Control Positivo con cada tanda de pruebas. El Control Negativo se debe probar en el pocillo A1, y el Control Positivo en el pocillo B1. Cada Control y muestra necesita un micropocillo para su procesamiento.
   a. Para optimizar los tiempos de lectura, la suspensión de microesferas debe estar bien mezclada antes de su empleo. El medio más efectivo de volver a suspender las microesferas es primero utilizar el vórtex con la suspensión de microesferas durante aproximadamente 30 segundos, seguido por la sonicación de la suspensión de microesferas durante 30 segundos en un pequeño sonicador de baño.
   b. Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que el contenido del ensayo se mezcle detenidamente. Entre los medios adecuados de mezcla se incluye mezclar la placa en un agitador de placa durante aproximadamente 30 segundos a 800 RPM aproximadamente, o ajustar una pipeta en aproximadamente ½ del volumen en la placa y aspirar y expulsar repetidamente (bomba arriba y bomba abajo) el contenido del pocillo durante un mínimo de 5 ciclos.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Control negativo	Etc.
B	Control positivo	
C	Paciente 1	
D	Paciente 2	
E	Paciente 3	
F	Paciente 4	
G	Paciente 5	
H	Paciente 6	

3. Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVe Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: El diluyente SAVe Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.** Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que las disoluciones de muestra se mezclen detenidamente según el punto 2b.
4. Después de determinar el número total de pocillos a procesar, utilice una pipeta multicanal o repetidora para dispensar 50 µL de suspensión de microesferas dentro de cada uno de los pocillos de la platina de filtración.
5. Transfiera 10 µL de cada muestra diluida (1:21) y el control de la placa de disolución a la placa de filtración. Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que las disoluciones de muestra se mezclen detenidamente según el punto 2b.
6. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 30 ± 10 minutos.
7. Después de la incubación, enjuague las microesferas mediante filtrado al vacío usando el tampón de lavado que se suministra diluido en la concentración 1x.
   a. Coloque la placa de filtración sobre el colector de vacío y extraiga la solución, dejando las microesferas detrás.
   b. Apague el vacío y añada 200 µL de Tampón de Lavado diluido 1x.
   c. Aplique el vacío y extraiga la solución.
   d. Repita los pasos 7b y 7c para un total de tres lavados.
8. A continuación del lavado final, secar suavemente el fondo de la placa y permitir que la placa se seque al aire durante 3 a 5 minutos antes de continuar con el siguiente paso.
9. Agregue 150 µl de conjugado a cada micropocillo a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras. Para obtener un rendimiento adecuado, es importante que el conjugado y la suspensión de microesferas se mezclen detenidamente según el punto 2b. Como una opción, mientras mezcle el conjugado y las microesferas, puede transferir la mezcla a pocillos vacíos de una placa de reacción de poliestireno.
10. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 30 ± 10 minutos.
11. Ajuste el instrumento **AtheNA Multi-Lyte** para analizar las reacciones seleccionado la plantilla TPO/Tg Plus. Consulte el manual del operador para obtener detalles sobre la operación del instrumento **AtheNA Multi-Lyte**. Los resultados se pueden leer en la placa del filtro o en una placa de reacción. **NOTA: Para obtener un análisis adecuado del espécimen, es importante que el instrumento se instale, calibre y mantenga de acuerdo con las instrucciones del fabricante.** Consulte el manual del instrumento para obtener información sobre la preparación del instrumento antes de la lectura de los resultados del ensayo.
12. La placa deberá leerse en los 60 minutos posteriores a la adición de la incubación del conjugado. Es posible que decida agitar la placa durante unos 15 segundos antes de la lectura. Este paso opcional puede reducir la cantidad de tiempo necesario para leer la placa.

Paso	Procedimiento de prueba abreviado
1	Diluya las muestras al 1:21 en SAVe Diluent®. Mezcle bien.
2	Combine 50 µL de suspensión de microesferas con 10 µL de la muestra diluido en un pocillo vacío. Mezcle bien.
3	Incube a temperatura ambiente durante 30 ± 10 minutos.
4	Enjuague las microesferas 3 veces con 200 µL de tampón de lavado (1x).
5	Seque suavemente el fondo de la placa y secar con aire durante 3 a 5 minutos.
6	Agregue 150 µL de conjugado en cada pocillo. Mezcle bien.
7	Transfiéralo a una placa de reacción (opcional).
8	Incube a temperatura ambiente durante 30 ± 10 minutos
9	Agite la placa (opcional).
10	Lea los resultados dentro de un periodo de 60 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. Cada vez que se realiza el ensayo, es necesario incluir el Control Negativo (en el pocillo A1) y el Control Positivo (en el pocillo B1).
2. La validez de la tirada se determina mediante la realización de los controles positivos y negativos. Estos criterios se analizan automáticamente mediante la *Intra-Well Calibration Technology*.
   a. El control negativo y el control positivo deben ser todos negativos en la microesfera no específica o de antígeno de control.
   b. El control negativo debe ser negativo para todos y cada uno de los analitos incluidos en la suspensión de microesferas.
   c. El control positivo debe ser postivo tanto para TPO como para Tg y debe cumplir los rangos específicos de lote para estos controles. Estos intervalos están codificados dentro del CD de calibración.
   d. Si no se cumple ninguno de los criterios anteriores, toda la tirada se considerará como no válida y se tendrá que repetir. **En este caso, no comunique los resultados del paciente.**
3. La validez de la muestra se basa en las características de las microesferas y sus interacciones con los sueros de los pacientes. Se supervisan diferentes parámetros automáticamente mediante la *Intra-Well Calibration Technology*. Si se determina que cualquiera de los criterios no cumple las especificaciones, los resultados del paciente se considerarán como no válidos y se deberán repetir. En caso de que esto se produzca, el informe de datos indicará la muestra en particular que se invalidó y el código de solución de problemas. Si una muestra resulta no válida repetidamente , se debe probar utilizando una metodología alternativa ya que es incompatible con el sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte®** Plus.
4. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas. Los controles externos deben ser representativos del suero humano normal debido a que el sistema de calibración **AtheNA Multi-Lyte** se basa parcialmente en las características de la muestra de suero. Si la formulación de la muestra es artificial (no es suero humano), se pueden producir resultados erróneos.
5. Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso de controles positivos y negativos para asegurar la funcionalidad de los reactivos y la ejecución adecuada del procedimiento del ensayo. Los requisitos de control de calidad se deben realizar en total cumplimiento con las normativas locales, autonómicas o estatales, o con los requisitos de acreditación y los procedimientos de control de Calidad normativos del laboratorio del usuario. Se recomienda que el usuario consulte CLSI EP12-A and 42 CFR 493.1256 para obtener información de ayuda sobre las prácticas de CC adecuadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Cálculos**
   a. Calibración del ensayo: El sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** TPO/Tg Plus de ZEUS utiliza la *Intra-Well Calibration Technology*. La *Intra-Well Calibration Technology* incluye una curva estándar con múltiples puntos dentro de la suspensión de microesferas. Con la *Intra-Well Calibration Technology*, cada pocillo del ensayo se calibra internamente sin que necesite la intervención del usuario. La curva estándar está diseñada para que se ajuste

automáticamente basándose en las características únicas del paciente o suero de control. Los valores del calibrador se asignan de acuerdo con los estándares internos de ZEUS, son específicos del lote y están codificados en el CD de calibración del lote.

b. Límite de referencia del analito: Cada analito del sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** TPO/Tg Plus de ZEUS tiene un límite de referencia asignado. ZEUS determina los límites de referencia para cada lote de sistema de pruebas, y están codificados en el CD de calibración del lote.

c. Mediante la tecnología *Intra-Well Calibration Technology*, todos los cálculos se realizan automáticamente cuando se utiliza el sistema **AtheNA Multi-Lyte**. La tecnología *Intra-Well Calibration Technology* ejecuta un análisis de regresión de las normativas internas, y a continuación ajusta los valores de unidad calculados basándose en una normativa adicional y en las características de la muestra de suero.

2. **Interpretaciones**

a. **Determinación de corte:** El corte para cada ensayo se estableció utilizando una población negativa para cada marcador. Los resultados de **AtheNA Multi-Lyte** se determinaron para esta población, y el corte se estableció en aproximadamente la media más tres veces la desviación estándar. Basándose en los resultados de esta prueba, el fabricante estableció las siguientes directrices para la interpretación de las muestras de los pacientes.

b. **Interpretación individual del analito antitiroideo**: Los valores unitarios de las muestras para los analitos multiplexados se interpretan de la siguiente manera:

	Valor unitario
Muestras negativas	< 100 IU/ml
Muestras positivas	> 120 IU/ml
Muestras dudosas	100 to 120 IU/ml

LIMITACIONES DEL ENSAYO

1. El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** TPO/Tg Plus de ZEUS es una herramienta para el diagnóstico, pero no es en sí una prueba diagnóstica. Los resultados de la prueba se deben interpretar junto con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos diagnósticos.
2. Las muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas pueden interferir con el resultado de este ensayo. Además, los especímenes con concentraciones de IgG anormales pueden interferir con el resultado de este ensayo. Debe evitarse el uso de estos tipos de muestras.

RESULTADOS ESPERADOS

La investigación clínica incluyó 150 muestras de donantes normales. Se supone que este grupo, en su mayor parte, no debería padecer la enfermedad y por tanto mostrará solo una baja incidencia de los autoanticuerpos TPO y Tg. La investigación también incluyó 300 muestras de pacientes diagnosticados con una enfermedad relacionada con autoanticuerpos asociada al anticuerpo antitiroideo. Con respecto al ensayo TPO; en la sangre del grupo de donantes normales, tres de las muestras resultaron inválidas en el ensayo, reduciendo el total a 147 muestras normales. De las 147 muestras, 137/147 (93,2%) fueron negativas, 3/147 (2,0%) fueron dudosas y 7/147 (4,8%) ofrecieron resultados positivos. Los resultados numéricos de esta población variaron desde un mínimo de 4 IU/ml a un máximo de 1183 IU/ml con resultado medio de 53 IU/ml y una mediana de 15 IU/ml. De las muestras clínicas (las que estaban diagnosticadas con una enfermedad tiroidea autoinmune), 0/300 (0%) fueron negativas, 0/300 (0%) fueron dudosas y 300/300 (100%) ofrecieron resultados positivos. Los resultados numéricos de esta población variaron desde un mínimo de 643 IU/ml a un máximo de 1207 IU/ml con resultado medio de 972 IU/ml y una mediana de 978 IU/ml. Con respecto al ensayo Tg; en la sangre del grupo de donantes normales, tres de las muestras resultaron inválidas en el ensayo, reduciendo el total a 147 muestras normales. De las 147 muestras, 133/147 (90,5%) fueron negativas, 3/147 (2,0%) fueron dudosas y 11/147 (7,5%) ofrecieron resultados positivos. Los resultados numéricos de esta población variaron desde un mínimo de 15 IU/ml a un máximo de 976 IU/ml con resultado medio de 78 IU/ml y una mediana de 44 IU/ml. De las muestras clínicas (las que estaban diagnosticadas con una enfermedad tiroidea autoinmune), 0/300 (0%) fueron negativas, 0/300 (0%) fueron dudosas y 300/300 (100%) ofrecieron resultados positivos. Los resultados numéricos de esta población variaron desde un mínimo de 428 IU/ml a un máximo de 1968 IU/ml con resultado medio de 1153 IU/ml y una mediana de 1188 IU/ml. Tanto el ensayo TPO como el Tg se han calibrado con los estándares establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). TPO se calibró de acuerdo con OMS 66/387 y Tg se calibró de acuerdo con OMS 65/93. Utilizando estos estándares, cada uno con un resultado esperado de 1000 IU/ml, el ensayo **AtheNA Multi-Lyte** TPO produjo un resultado de 1080 IU/mL y el ensayo **AtheNA Multi-Lyte** Tg produjo un resultado de 1126 IU/ml.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. **Estudio comparativo**

Se ha realizado un estudio comparativo interno para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** TPO/Tg Plus de ZEUS con el sistema de pruebas ELISA comercializado. El rendimiento se evaluó usando 750 muestras: 150 de sueros de donantes normales, 300 muestras enviadas previamente a un laboratorio para una prueba de autoanticuerpos tiroidales rutinarias, y 300 muestras de personas enfermas de pacientes diagnosticados clínicamente con trastornos tiroideos autoinmunes. Los resultados de la investigación se resumen en las tablas 1 y 2 siguientes:

Tabla 1: Rendimiento del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte TPO Plus de ZEUS en relación a ELISA TPO IgG

		Resultado de ELISA			
		Positivo	Negativo	Dudoso**	Total:
AtheNA Resultados	Positivo	531	31	33	595
	Negativo	0	143	0	143
	Dudoso**	0	7	0	7
	Total:	531	181	33	745*

Sensibilidad relativa = 531/531 = 100%. Especificidad relativa = 143/174 = 82,2%. Concordancia relativa = 674/705 = 95,6%

* Cinco muestras resultaron inválidas con AtheNA. Sus resultados se excluyeron de los cálculos de la sensibilidad relativa, especificidad y acuerdo.

**Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos de sensibilidad, especificidad y concordancia. Las notables diferencias en el número de muestras dudosas entre ELISA y AtheNA se atribuyen a la diferencia en las metodologías de AtheNA y ELISA. AtheNA generalmente presenta un mayor rendimiento señal/ruido en relación con ELISA y por lo tanto puede discriminar mejor entre muestras negativas y positivas, a la vez que minimiza el número de muestras que caen dentro de la zona dudosa.

Sensibilidad clínica del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte TPO Plus de ZEUS

La sensibilidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** TPO Plus de ZEUS se evaluó utilizando 300 muestras de suero definidas clínicamente de pacientes diagnosticados con una enfermedad tiroidea autoinmune. En este grupo, la totalidad de las trescientas muestras resultaron positivas para el anticuerpo TPO IgG. La sensibilidad clínica del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte TPO IgG se determinó en 300/300 o 100%.

Especificidad clínica del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte TPO Plus de ZEUS

La especificidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** TPO Plus de ZEUS se evaluó mediante 150 muestras de donantes normales, dado que se partía de la base de que dicho grupo no estaría sufriendo enfermedades autoinmunes. Tres de las muestras arrojaron resultados inválidos con AtheNA, dejando 147 muestras. De las 147 muestras, 7/147 fueron positivas en AtheNA, 3/147 fueron dudosas en AtheNA y 137/147 ofrecieron resultados negativos en AtheNA. La especificidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** TPO Plus de ZEUS se determinó en 137/147 o 93,2 %. Expresado como un intervalo de confianza del 95%, la especificidad clínica se determinó en un rango de 89,1% a 97,3%.

Tabla 2: Rendimiento del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte Tg Plus de ZEUS en relación a ELISA Tg IgG

		Resultado de ELISA			
		Positivo	Negativo	Dudoso**	Total:
AtheNA Resultados	Positivo	575	9	23	607
	Negativo	0	135	0	135
	Dudoso**	0	3	0	3
	Total:	575	150	23	745*

Sensibilidad relativa = 575/575 = 100%. Especificidad relativa = 135/144 = 93,8%. Concordancia relativa = 710/719 = 98,8%

* Cinco muestras resultaron inválidas con AtheNA. Sus resultados se excluyeron de los cálculos de la sensibilidad relativa, especificidad y acuerdo.

** Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos de sensibilidad, especificidad y concordancia

Sensibilidad clínica del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte Tg Plus de ZEUS

La sensibilidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** Tg Plus de ZEUS se evaluó utilizando 300 muestras de suero definidas clínicamente de pacientes diagnosticados con una enfermedad tiroidea autoinmune. En este grupo, la totalidad de las trescientas muestras resultaron positivas para el anticuerpo Tg IgG. La sensibilidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** Tg Plus de ZEUS se determinó en 300/300 o 100%.

Especificidad clínica del sistema de prueba AtheNA Multi-Lyte Tg Plus de ZEUS

La especificidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** Tg Plus de ZEUS se evaluó mediante 150 muestras de donantes normales, dado que se partía de la base de que dicho grupo no estaría sufriendo enfermedades autoinmunes. Tres de las muestras arrojaron resultados inválidos con AtheNA, dejando 147 muestras. De las 147 muestras, 11/147 fueron positivas en AtheNA, 2/147 fueron dudosas en AtheNA y 134/147 ofrecieron resultados negativos en AtheNA. La especificidad clínica del sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** Tg Plus de ZEUS se determinó en 134/147 o 91,2%. Expresado como un intervalo de confianza del 95%, la especificidad clínica se determinó en un rango de 86,6% a 95,7%.

2. **Reproducibilidad**

Se llevó a cabo una evaluación en nuestros laboratorios del intraensayo y de la reproducibilidad del intraensayo. Se probaron seis muestras. En cada día de prueba, cada muestra se diluyó dos veces y después de cargó para cuatro replicados, resultando en un total de ocho pozuelos para cada una de las seis muestras. Este protocolo se siguió durante tres días. Los resultados se utilizaron para calcular valores medios en UI/ml, desviaciones típicas y porcentaje de coeficiente de variación (CV). Las muestras se seleccionaron de tal manera que resultó que dos de ellas eran claramente negativas, dos eran claramente positivas y se seleccionaron dos que eran positivas débiles. Los resultados de este estudio se resumen en las tablas 3 y 4, a continuación:

Tabla 3: Estudio de precisión de AtheNA Multi-Lyte TPO Plus de ZEUS

ID de la muestra	Característica	Resultados día 1		Resultados día 2		Resultados día 3	
		Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2
1	Positivo fuerte	1229	1196	1202	1254	1224	1252
		1085	1223	1098	1164	1191	1118
		1170	1218	1189	1093	1191	1206
		1201	1174	1314	1136	1343	1174
2		1185	1134	1103	1122	1138	1117
		1126	1160	1140	1150	1175	1122
		1083	1079	1050	1087	1185	1164
		1149	1181	1055	1008	1060	11067
3	Positivo	259	267	351	328	312	346
		249	266	261	295	362	360
		295	259	309	207	327	297
		297	289	313	296	314	310
4		266	296	310	235	317	346
		293	276	263	235	309	311
		270	269	283	253	295	322
		318	276	247	260	242	303
5	Negativo	4	5	6	7	7	6
		4	5	6	6	5	6
		4	5	8	6	5	5
		3	4	6	7	6	7
6		6	5	6	7	8	8
		5	4	6	7	5	7
		5	5	6	4	6	6
		6	5	7	6	8	7

ID de la muestra	Cálculos	Precisión interensayo			Precisión interensayo
		Día 1	Día 2	Día 3	
1	VI	1187	1180	1212	193
	DE	46,53724	77,75603	65,57643	63,32340
	%CV	3,9	6,6	5,4	5,3
2	VI	1137	1089	1129	1118
	DE	40,21882	49,05955	46,83405	48,40290
	%CV	3,5	4,5	4,2	4,3
3	VI	273	295	329	299
	DE	18,39206	44,15233	24,61126	37,82509
	%CV	6,7	15,0	7,5	12,7
4	VI	283	261	306	283
	DE	17,91249	25,35885	29,84693	30,24439
	%CV	6,3	9,7	9,8	10,7
5	VI	4	7	6	6
	DE	0,707107	0,755929	0,834523	1,21509
	%CV	16,6	11,6	14,2	21,9
6	VI	5	6	7	6
	DE	0,64087	0,991031	1,125992	1,16018
	%CV	12,5	16,2	16,4	19,2

Tabla 3: Estudio de precisión de AtheNA Multi-Lyte Tg Plus de ZEUS

ID de la muestra	Característica	Resultados día 1		Resultados día 2		Resultados día 3	
		Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 1	Dilución 2
1	Positivo fuerte	2936	2685	2725	2864	3006	2931
		2557	2874	2798	2621	2543	2721
		2762	2921	2894	2644	2909	3109
		2958	2831	2938	2686	3155	2629
2		3007	2807	2714	2950	2935	2832
		2659	2869	2912	2931	2949	2852
		2808	2955	2741	2690	2942	2837
		2860	2894	2700	2598	2739	2700
3	Positivo	294	328	378	342	201	233
		299	324	327	288	226	217
		291	286	331	270	204	207
		324	296	330	312	206	242
4		248	267	304	312	327	324
		287	262	282	263	290	340
		269	301	319	266	329	344
		283	267	184	268	326	307
5	Negativo	21	20	18	19	23	24
		20	19	20	16	22	17
		20	18	19	16	19	24
		17	23	16	18	18	23
6		18	18	20	15	19	23
		19	20	18	17	19	20
		20	16	19	11	25	21
		14	18	16	18	19	14

ID de la muestra	Cálculos	Precisión interensayo			Precisión interensayo
		Día 1	Día 2	Día 3	
1	VI	2816	2771	2875	282
	DE	139,5575	119,7411	223,3076	165,43184
	%CV	5,0	4,3	7,8	5,9
2	VI	2857	2780	2848	2828
	DE	105,3768	132,3545	93,18453	112,31470
	%CV	3,7	4,8	3,3	4,0
3	VI	305	322	217	282
	DE	17,09428	33,09186	15,15633	52,08605
	%CV	5,6	10,3	7,0	18,5
4	VI	273	275	323	290
	DE	16,53568	4,67736	17,46783	36,04323
	%CV	6,1	15,5	5,4	12,4
5	VI	20	17	21	19
	DE	1,832251	1,846812	2,815772	2,66995
	%CV	9,3	10,6	13,3	13,7
6	VI	18	17	20	18
	DE	2,03101	2,748376	3,251373	2,88424
	%CV	11,4	16,0	16,3	15,7

3. **Reactividad cruzada y sustancias interferentes**

El sistema de pruebas **AtheNA Multi-Lyte** TPO/Tg Plus de ZEUS se evaluó por si presentaba reactividad cruzada con otros anticuerpos e interferencias de componentes del suero. Para este estudio, se evaluaron un total de 39 muestras. Diecinueve de las muestras resultaron positivas para varios anticuerpos autoinmunes y enfermedades infecciosas. De las diecinueve muestras evaluadas, una resultó reactiva al ensayo **AtheNA Multi-Lyte** Tg Plus de ZEUS. La misma muestra no resultó reactiva con ELISA. Se evaluaron un total de 20 muestras que contenían sustancias potencialmente interferentes. Estos 20 especímenes contenían, o bien, niveles anormales de hemólisis (n=5), bilirubina (n=5), concentración de IgG por encima de lo normal (n=5), o bien, niveles de lípidos por encima de lo normal (n=5). Cinco de las muestras resultaron positivas utilizando el sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** TPO Plus de ZEUS. Cuatro de esas cinco muestras también fueron positivas en el TPO de ELISA. Cuatro de las muestras resultaron positivas utilizando el sistema de prueba **AtheNA Multi-Lyte** Tg Plus de ZEUS. Dos de esas cuatro muestras también fueron positivas en el Tg de ELISA.

REFERENCIAS

1. Beall GN, Solomon DH: Post. Grad. Med. 54:181, 1973.
2. Tung KS, Ramos CV, Deodhar SD: Am. J. Clin. Pathol. 61:549, 1974.
3. Beall GN, Solomon DH: Ed Samter, 2nd Edition, Boston, Little, Brown and Company, pp. 1198-1213, 1971.
4. Doniach D, and Roitt IM: Clin. Immunol. 2nd Edition (Ed) Gell PH, and Coombs RRA, Oxford, Blackwell, Chapter 35, 1968.

5. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
6. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture – Second edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
7. Procedures for the Handling and Processing of blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
8. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

ZEUS Scientific, Inc.
200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, EE. UU.
Llamada gratuita (EE. UU.): 1-800-286-2111, opción 2
Internacional: +1 908-526-3744
Fax: +1 908-526-2058
Página Web: www.zeusscientific.com
AtheNA Multi-Lyte y SAVe Diluent® son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para consultas al Servicio de atención al cliente en EE.UU., contacte con su distribuidor local.
Para consultas al Soporte técnico, contacte con ZEUS Scientific, llame de forma gratuita o escriba a support@zeusscientific.com.
Para consultas al Servicio de atención al cliente y al Soporte técnico desde fuera de EE.UU., contacte con su distribuidor local.

© 2015 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

EC REP
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299